

PCT

WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM

Internationales Büro

INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation ⁷ : A61K 7/48, 31/715		A1	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 00/38647
			(43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 6. Juli 2000 (06.07.00)
<p>(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP99/10336</p> <p>(22) Internationales Anmeldedatum: 22. Dezember 1999 (22.12.99)</p> <p>(30) Prioritätsdaten: 198 60 544.7 23. Dezember 1998 (23.12.98) DE</p> <p>(71) Anmelder (<i>für alle Bestimmungsstaaten außer US</i>): ES-PARMA GMBH [DE/DE]; Lange Göhren 3, D-39171 Osterweddingen (DE). HANS-KNÖLL-INSTITUT FÜR NATURSTOFF-FORSCHUNG E.V. [DE/DE]; Beutenbergstrasse 11a, D-07745 Jena (DE). FRIEDRICH-SCHILLER-UNIVERSITÄT JENA [DE/DE]; Fürstengraben 1, D-07743 Jena (DE). INSTITUT FÜR ANGEWANDTE DERMATOPHARMAZIE AN DER MLU UNIVERSITÄT HAUTKLINIK [DE/DE]; Ernst-Kromayer-Strasse 5-8, D-06097 Halle/Saale (DE).</p> <p>(71)(72) Anmelder und Erfinder: WOHLRAB, Wolfgang [DE/DE]; Beesener Strasse 221 C, D-06110 Halle (DE). NEUBERT, Reinhard [DE/DE]; Schwuchstrasse 11F, D-06120 Halle (DE).</p>			
<p>(72) Erfinder; und</p> <p>(75) Erfinder/Anmelder (<i>nur für US</i>): HUSCHKA, Christoph [DE/DE]; Gustav-Hertzberg-Strasse 8, D-06110 Halle (DE). MÜLLER, Peter-Jürgen [DE/DE]; Hans-Knöll-Institut für Naturstoff-Forschung e.V. Jena, Beutenberg Strasse 11, D-07745 Jena (DE). OZEGOWSKI, Jörg-Herman [DE/DE]; Institut für experimentelle Mikrobiologie der FSU Jena, D-07745 Jena (DE). KOEGST, Dieter [DE/DE]; Epsarma GmbH, Lange Göhren 3, D-39171 Osterweddingen (DE). FRIES, Gerhard [DE/DE]; Epsarma GmbH, Lange Göhren 3, D-39171 Osterweddingen (DE).</p> <p>(74) Anwalt: PFENNING MEINIG & PARTNER GBR; Mozartstrasse 17, D-80336 München (DE).</p> <p>(81) Bestimmungsstaaten: AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW, ARIPO Patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).</p>			
<p>Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht.</i> <i>Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist; Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.</i></p>			

(54) Title: **SKIN PROTECTION AGENTS CONTAINING A FRAGMENT MIXTURE PRODUCED FROM HYALURONIC ACID BY HYDROLYSIS**(54) Bezeichnung: **MITTEL ZUM SCHUTZ DER HAUT, ENTHALTEND EIN AUS HYALURONSÄURE DURCH HYDROLYSE HERGESTELLTES FRAGMENTGEMISCH****(57) Abstract**

The invention relates to an agent for the treatment, prophylaxis and metaphylaxis of functional and structural disorders of the skin caused by external factors. The agent contains a hyaluronic acid which has been partially digested with a microbiological hyaluronate lyase. The hyaluronic acid fragment mixture is processed into different galenic formulations to which other hydrophilic and/or lipophilic active ingredients and/or auxiliary substances can be added. The invention is suitable for use in human and veterinary medicine in the treatment and/or prophylaxis of skin damage caused by environmental factors, including UV; dry skin conditions and skin ageing.

(57) Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft Mittel zur Behandlung, Prophylaxe und Metaphylaxe von Funktions- und Strukturstörungen der Haut infolge äußerer Einwirkungen. Das Mittel enthält eine mit einer mikrobiologischen Hyaluronatlyase partiell verdaute Hyaluronsäure. Das Hyaluronsäurefragmentgemisch wird in unterschiedliche galenische Formulierungen eingearbeitet, denen weitere hydrophile und/oder lipophile Wirkstoffe und/oder Hilfsstoffe zugesetzt werden können. Anwendungsgebiete der Erfindung in der Human- und Veterinärmedizin betreffen die Therapie und/oder die Prophylaxe von umweltbedingten, einschließlich UV-bedingten Hautschäden, trockenen Hautzuständen sowie die Hautalterung.

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidschan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauretanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumanien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		

5

MITTEL ZUM SCHUTZ DER HAUT, ENTHALTEND EIN AUS HYALURONSÄURE DURCH HYDROLYSE HERGESTELLTES FRAGMENTGEMISCH

10

15

20 Die Erfindung betrifft Mittel bzw. galenische Formulierungen zur Behandlung, Prophylaxe und Metaphylaxe von Funktionsstörungen der Haut infolge äußerer Einwirkung und/oder als Folge anderer Erkrankungen. Sie hat ihre bevorzugten Anwendungsgebiete in der Human- und Veterinärmedizin bei der Therapie, der Prophylaxe bzw. Metaphylaxe von umweltbedingten, insbesondere durch die Einwirkung energiereicher Strahlung oder die Wirkung toxischer Sauerstoff-Spezies bedingter Hautschäden, trockenen Hautzuständen, Hautalterung oder Lichtempfindlichkeit der Haut, die sich als erythematöse, entzündliche, allergische oder autoimmunreaktive Erscheinungen manifestieren. Weiterhin betrifft die Erfindung unterschiedliche galenische Zubereitungen, die unter kosmetischer und/oder dermatologische Sicht der Hautpflege dienen.

25

30

35

ERSATZBLATT (REGEL 26)

5 In galenischen Formulierungen, die gegen das UV-Licht schützen sollen, sind vorwiegend Lichtabsorber enthalten. Um die epidermale Schädigung der Strahlung zu vermindern, werden einerseits Substanzen eingesetzt, die den UVB-Bereich des Sonnenlichtes zwischen 280 und 320 nm absorbieren. Auf der anderen Seite werden Stoffe eingearbeitet, die im Bereich von 320 bis 400 nm das UVA-Licht absorbieren können. Somit sollen mögliche dermale Schäden, die die elastischen Fasern und das Kollagengerüst und die daran sichtbar ge- knüpfte Hautalterung betreffen, vermieden werden. Eine weitere Möglichkeit der Abwendung der Beeinträchtigung durch das UV-Licht, besteht durch die Anwendung von mikronisierten Partikel (physikalischer Lichtschutz), die das Licht auf der Hautoberfläche reflektieren.

10 20 Die UV-Strahlung führt zu photochemischen Reaktionen, wobei die photochemischen Reaktionsprodukte, insbesondere toxische Sauerstoffprodukte, den Stoffwechsel der Haut negativ beeinflussen. Bei den vom Sauerstoff abgeleiteten toxischen Sauerstoffprodukten handelt es sich beispielsweise um energieaktivierte Sauerstoffatome. Ein Vertreter dieser reaktiven Spezies ist der Singuletsauerstoff, der gegenüber dem normalen diradikalischen Tripletsauerstoff wesentlich reaktionsfähiger ist. Weitere radikalische Derivate sind das Superoxidanion und das Hydroxylradikal. Als Intermediate bei der Umwandlung des Superoxidanions in das Hydroxylradikal tritt Wasserstoffperoxid, bei weiteren Reaktionen auch schädliche Epoxide auf. Diese toxischen Sauerstoffspezies sowie die Reaktionsprodukte mit den Hautbestandteilen, entstehen auch im Verlauf des normalen Metabolismus in begrenztem Maß. Bei Ex-

15 25 30 35

position zu energiereicher Strahlung werden sie in Übermaß gebildet und sind die Ursache für pathologische Hautzustände und die beschleunigte Hautalterung ("Skin Diseases Assoziated with Oxidative Injury". In 5 "Oxidative Stress in Dermatology", Marcel Decker Inc. N.Y., Basel, Hong Kong, Herausgeber J. Fuchs und Lester Packer).

Um gebildete toxische Sauerstoffprodukte zu neutralisieren 10 und um Oxidationsvorgänge zu kontrollieren, werden Substanzen eingesetzt, die Radikale fangen und auslöschen (radical scavenger) und/oder die als Antioxidantien wirken. Solche Radikalfänger werden in großer Zahl in der Literatur beschrieben. Oftmals 15 werden sie auch als primäre Antioxidantien bezeichnet, weil sie oxidative Prozesse durch Abbruch der radikalischen Kettenreaktion hemmen. Die bekanntesten, in topischen Formulierungen eingesetzten primären Antioxidantien sind beispielsweise Sesamol, Gall- 20 säure, Flavone bzw. Flavonoide (EP OS 595 694, DE 197 42 025A, DE 197 39 044, DE 196 51 428, DE OS 586 303 und EP OS 595 694). In DE 197 42 025A, werden Flavone und Flavonoide als Wirksubstanzen gegen die altersbedingte Vernetzung von dermalen Proteinen, die als Ursache 25 von Altersflecken gesehen wird, angegeben.

Nachteilig an all diesen Verbindungen ist, daß sie entweder synthetischen Ursprungs sind bzw. aus Pflanzen und Tieren extrahiert werden müssen. Sie sind in 30 der Konzentration, in der sie topisch angewendet werden, unphysiologisch und es ist bei ihrer Anwendung keine Garantie für ihre gesundheitliche Unbedenklichkeit, insbesondere bei Langzeiteinwirkung gegeben. Das Tocopherol bzw. Vitamin E (US 4,144,325 und 35 4,248,861), welches besonders die Autoxidation von Fetten inhibiert, kommt im menschlichen Organismus

vor. Da Vitamin E an einer Reihe von Stoffwechselvorgängen beteiligt ist, ist eine Überversorgung nicht unbedenklich.

5

Eine andere Substanz, die im menschlichen Organismus vorkommt und biotechnisch mit Hilfe von Mikroorganismen hergestellt werden kann, ist die Hyaluronsäure. Bei ihr handelt es sich um ein besonders unbedenkliches Biopolymer, welches im Säugling strukturbildend in entsprechend großen Mengen vorkommt. Als Hydrokolloid ist sie in der Lage, viel Wasser zu binden.

15 Hydrokolloide Substanzen werden in Zubereitungen zur externen Anwendung eingesetzt, um die Wasserbindekapazität der Verbindungen zu nutzen. Besonders die hoch biokompatible Hyaluronsäure ist in vielen Formulierungen als wasserbindende Substanz vorhanden.

20 (U.S. Patent Nr. 5,882,664, 5,391,373, 5,254,331, 5,087,446). Neben Tanninen oder Catechinen als Sauerstoffradikalfänger zum Entfernen von aktiven Sauerstoff und freien Radikalen, wird Hyaluronsäure in JP-9241637 in einer Formulierung als wasserbindende Substanz angegeben. In U.S. Pat. Nr. 5,571,503 wird 25 Hyaluronsäure neben den Estern des Vitamins E, Retinol und Vitamin C in Sonnenschutzcremes und im U.S. Patent Nr. 5,866,142 und 5,942,245 neben Antioxidantien wie Superoxiddismutase, Cystein und Vitamin E zur Verbesserung der Hydratation der Haut vorgeschlagen.

30 Der Hyaluronsäure werden neben der wasserbindenden Eigenschaft wundheilende, die Gefäßbildung fördernde und die Penetration verbesserte Eigenschaften zugeschrieben. In topischen Kompositionen nach DE 198 05 35 827A bewirkt Hyaluronsäure einen Schutz der Haut vor

5

Irritationen. In U.S. Patent Nr. 5,728,391 wird in einem Mittel gegen Hauterkrankungen, Hyaluronsäure mit einer Molmasse zwischen 800 und 4.000 D vorgeschlagen.

10

Besonders niedermolekulare Hyaluronsäurefraktionen, die beispielsweise aus hochmolekularer Hyaluronsäure tierischer Herkunft durch Spaltung mit Ultraschall bei Anwesenheit von Hypochlorit (EP 0 944 007) hergestellt werden, haben eine wundheilende bzw. die Gefäßbildung fördernde Eigenschaften. In U.S. Pat. Nr. 4,303,676 werden Hyaluronsäuremischungen zwischen einer Hyaluronsäurefraktion mit Molmassen von 10 bis 15 200 kD und einer zweiten Fraktion mit 1.000 und 4.500 kD aus Hahnenkämmen vorgeschlagen.

20

Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es deshalb, ein Mittel zum Schutz der Haut vorzuschlagen, das insbesondere biokompatibel ist und für die Langzeitanwendung in der Human- und Veterinärmedizin geeignet ist. Das Mittel soll geeignet sein für die Therapie und/oder die Prophylaxe von umweltbedingten und/oder als Folge anderer Erkrankungen, einschließlich der Einwirkung energiereicher Strahlung oder der Wirkung von toxischen sauerstoffformbedingten Hautschäden, traumatischen Erscheinungen sowie Entzündungen und Alterungsprozessen, ohne daß Nebenwirkungen auftreten. Weiterhin ist es eine Aufgabe der vorliegenden Erfindung, daß das Mittel für die hautpflegende bzw. hautschützende Anwendung unter kosmetischer und/oder dermatologischer Sicht eingesetzt werden kann.

30

35

Die Aufgabe wird durch die kennzeichnenden Merkmale des Patentanspruches 1 gelöst. Die Unteransprüche

zeigen vorteilhafte Weiterbildungen auf.

5 Erfindungsgemäß weist somit das Mittel zum Schutz der Haut ein enzymatisch aus Hyaluronsäure hergestelltes Fragmentgemisch so wie an und für sich bekannte pharmazeutische Träger und Hilfsstoffe auf.

10 Bevorzugt ist es hierbei, wenn als Enzym eine mikrobiell hergestellte Hyaluronatlyase eingesetzt wird.

15 Der allgemeine Begriff Hyaluronidasen beschreibt drei unterschiedlich wirkende hyaluronsäurespaltende Enzymtypen [J. Ludowieg: The Mechanism of Hyaluronidases, JBC 236, 333-339 (1961)]. Es sind einmal die Endohydrolasen, welche die β -(1-3)-Bindungen hydrolytisch spalten. Zu ihnen gehören die Mehrzahl der Hyaluronidasen aus höheren Organismen, beispielsweise die Hyaluronidase aus Rinderhoden. Diese Hyaluronat-Glycanhydrolasen (Enzymklasse E.C. 3.2.1.35/36) spalten neben den Bindungen der Hyaluronsäure in einem begrenzten Maße auch andere Glycosaminoglycane. Einen weiteren Typ stellt die Endo- β -Hyaluronidase aus dem Blutegel dar, welche die β -(1-4)-Bindung hochspezifisch spaltet. Der dritte Enzymtyp, die Hyaluronatlyase (Enzymklasse: EC 4.2.2.1), spaltet die Hyaluronsäure in der β -(1-4)-Bindungen nach einem Eliminierungsmechanismus unter Bildung einer Doppelbindung in (4-5)-Stellung an der Glucuronsäure. Für Lyasen werden in der Literatur Endo- und Exospaltmechanismen 20 angegeben.

25

30

35 Die Erfinder konnten zeigen, daß insbesondere bei der bevorzugten Ausführungsform mit der Hyaluronatlyase ungesättigte Fragmente entstehen, die offensichtlich

aufgrund der endständigen Doppelbindungen ausgezeichnete Eigenschaften aufweisen.

5 Bevorzugt wird das Mittel hergestellt, indem niedermolekulare, ungesättigte Fragmente, die aus hochmolekularer Hyaluronsäure durch die Einwirkung des Enzyms Hyaluronatlyase aus einem Mikroorganismus, bevorzugt aus einem Streptococcus, insbesondere der Streptococcus 10 agalactiae nach einem Elimierungsmechanismus in einer wässrigen Lösung entstehen, in das Mittel eingebracht wird.

15 Überraschenderweise hat es sich gezeigt, daß die erfundungsgemäß verwendeten ungesättigten niedermolekularen Hyaluronsäurefragmente enthaltenden Mittel eine bessere Wirkung als Antioxidans, als Radikalfänger, als Inhibitor der Bildung schädlicher Photoprodukte, als Mittel gegen die Hautalterung, als Schutz gegen 20 Photoreaktionen und als Inhibitor entzündlicher Reaktionen und generellem Schutz vor toxischen Substanzen aufweisen würden als Mittel, welche die natürliche Hyaluronsäure tierischer oder biotechnischer Hyaluronsäure bzw. deren niedermolekularen gesättigten hydrolytischen Spaltprodukte entsprechend des Standes 25 der Technik enthalten. Diese zusätzliche Wirkung steht offensichtlich in einem direkten Zusammenhang mit der Existenz der Doppelbindungen in den erfundungsgemäß hergestellten Fragmenten.

30 Andere, nicht auf Hyaluronsäure basierende Antioxidantien und Radikalfänger mögen in Teilbereichen der aufgeführten Wirkungen gleichartig oder besser wirken, sie weisen jedoch als häufig nichtphysiologische Wirkstoffe nicht die hohe Biokompatibilität der ungesättigten Hyaluronsäurefragmente auch bei sehr hohen 35

5 Anwendungsdosen auf. Weiterhin besitzen die ungesättigten Fragmente analog den entsprechenden gesättigten Fragmenten der Hyaluronsäure die natürliche Wasserhaltefähigkeit, den hydrokolloiden Charakter sowie die strukturgebenden Eigenschaften der ungesättigten Fragmente.

10 Das erfindungsgemäße Mittel enthält weiterhin pharmazeutische Träger und/oder weitere hydrophile und/oder lipophile Wirkstoffe und/oder Hilfsstoffe. Die als Ausgangssubstanz eingesetzte hochmolekulare Hyaluronsäure kann biotechnisch oder aus tierischem Gewebe hergestellt worden sein. In einer Ausführung wird die Hyaluronatlyase an einen festen Träger immobilisiert 15 bei der Eliminierung eingesetzt. Die erfindungsgemäßen ungesättigten niedermolekularen Fragmente besitzen Molmassen zwischen 1 und 1.500 kD, vorzugsweise zwischen 10 und 300 kD. Bei der Herstellung der erfindungsgemäßen Formulierungen werden in einer Variante die niedermolekularen ungesättigten Fragmentgemische in flüssiger Form mit Konzentrationen zwischen 20 1,0 g/l und 500 g/l in Mengen von 0,01 bis 0,7 g pro g Formulierung eingearbeitet.

25 In einer anderen Variante werden die Fragmente in fester Form in Mengen zwischen 0,01 bis 0,7 g pro g Formulierung eingearbeitet.

30 Die erfindungsgemäße Formulierung wird in Form einer Paste, einer Salbe, einer Creme, einer Emulsion, eines Gels, einer Stiftmasse, eines kolloidalen Trägersystems oder einer Lösung, bevorzugt jedoch als O/W-Emulsion hergestellt. Vorteilhaft ist, daß hierbei der radikalbindende Wirkstoff gleichzeitig eine der 35 gesättigten Hyaluronsäure entsprechende hohe Wasserhaltefähigkeit besitzt.

5 In dem Mittel können pharmazeutische Träger und/oder hydrophile und/oder lipophile Wirkstoffe und/oder Hilfsstoffe enthalten sein. Das Fragmentgemisch und/oder weitere Wirkstoffe und/oder die Hilfsstoffe können in ein kolloidales Trägersystem, vorzugsweise in Nanopartikel, Liposomen oder Mikroemulsionen eingearbeitet vorliegen.

10 Als Hilfsstoff kann ein Penetrationsmodulator, beispielsweise Harnstoff in Mengen von 0,01 bis 0,4 g pro g Formulierung vorhanden sein. Die erfindungsgemäße Formulierung kann weiterhin andere Substanzen mit Radikalfängereigenschaften, vorzugsweise Vitamin E und Vitamin C enthalten.

15 Ohne die Erfindung dadurch auf einen Herstellungsprozeß festzulegen, soll eine typische Herstellungsprozedur für die erfindungsgemäßen niedermolekularen ungesättigten Fragmente beispielhaft dargestellt werden. Das bevorzugt eingesetzte Enzym Hyaluronatlyase besitzt im Gegensatz zu anderen Hyaluronatlyasen mikrobiellen Ursprungs, eine Molmasse von etwa 116 kD und einen isoelektrischen Punkt von pH 8,74 und wirkt als Endo-Eliminase. Der Einsatz von Enzymen tierischer Herkunft ist ausdrücklich nicht Teil der vorliegenden Erfindung, sondern wird für die vorliegende Erfindung ausgeschlossen.

20 25 30 Während der Eliminierungsreaktion liegt die Hyaluronsäure in wässriger Lösung vor. Das Enzym wird als wässrige Lösung zugesetzt und der Reaktionsverlauf an Hand der Viskositätsabnahme oder über andere Methoden der Molmassebestimmung der Fragmente die Reaktion verfolgt. Die Reaktion wird durch Erwärmen auf eine

35

Temperatur von 80 °C durch Denaturierung des Enzyms abgebrochen. Aus dem Ansatz werden die Fragmente nach vorheriger Abtrennung von proteinhaltigen Fremdstoffen, durch Fällung in Ethanol oder durch Gefrier-trocknung als Festsubstanz hergestellt. In einer anderen Ausführungsart wird das Enzym in einer festen, an einen Träger-immobilisierten Form vorgelegt. Vorteilhaft an der Verwendung der Träger-immobilisierten Form des Enzyms ist, daß bei der Herstellung der Fragmente kein Enzym in der Reaktionslösung verbleibt.

Die Erfindung wird nachfolgend durch Herstellungbeispiele, Toxizitätsuntersuchungen, Bestimmungen der Lebendzellanzahl nach UV-Bestrahlung sowie spezifisch galenische Formulierungen näher beschrieben.

Beispiel 1

Zur Herstellung der ungesättigten, niedermolekularen Hyaluronsäurefragmente nach einem Eliminierungsmechanismus werden 0,5 g hochmolekulare biotechnisch hergestellte Hyaluronsäure mit einer durchschnittlichen Molmasse von 1,800 kD in 100 ml 0,05 M Acetatpuffer mit einer Acidität von pH 7,0 innerhalb von 12 Stunden unter Rühren bei 37 °C gelöst. Anschließend wird die Lösung unter Rühren mit 10. 000 IU Hyaluronatlyase, gewonnen aus *Streptococcus agalactiae*, für 30 min inkubiert. Nach dieser Zeit wird die Lösung 5 min auf 85 °C erhitzt und dann schnell auf 20 °C abgekühlt. Das entstandene Fragmentgemisch wird gegen destilliertes Wasser dialysiert. Anschließend erfolgt lyophile Trocknung der Lösung. Von dem Fragmentgemisch wird viskosimetrisch die mittlere Molmasse bestimmt. Die entstandene Fragmente haben eine durchschnittliche Molmasse von 150 kD.

5

Beispiel 2

Die Eigenschaft, reduzierende Radikale zu binden,
wird in zellfreien Systemen mit einem Lucigenin ver-
stärkten Xanthin-Oxidase-Test an Hand der Umwandlung
10 von Hypoxanthin zu Harnsäure gemessen. Die hierbei
entstehenden O₂-Radikale lassen sich mit Lucigenin
durch relative Chemilumineszenz-Messung nachweisen.
Durch anwesende Radikalfänger werden die O₂-Radikale
neutralisiert und die Chemielumineszenzausbeute ver-
ringert. Als Standard wird Allopurinol (Sigma Chemi-
15 cals Co) eingesetzt, eine Substanz, welche die Xan-
thin-Oxidase stark hemmt. Eine Menge von 1 mg des er-
findungsgemäßen Hyaluronsäurefragmentes mit einer
Molmasse von 100 bis 160 kD besitzen eine Radikalbin-
20 dungaktivität, die der von 200 bis 400 µg Allopurinol
entspricht. Hyaluronsäure mit einer Molmasse von
1.800 kD hat dagegen eine vernachlässigbare radikal-
bindende Aktivität (Pierce, L. A., W. O. Tarnow-Mordi
and I. A. Cree: Antibiotics Effects on Phagocyte Che-
25 miluminescence in Vitro. In J. Clin. Lab. Res.-
(1995) 25; 93 -98).

30

**Toxizitätsuntersuchungen an humanen Keratinozyten
(Abbildungen 1 bis 5)**

35

Zur Charakterisierung des Einflusses von Hyaluronsäu-
refragmenten unterschiedlicher Molmasse auf das Pro-
liferationsverhalten von humanen Keratinozyten
(HaCaT Keratinozyten - zur Verfügung gestellt von
Prof Dr. Norbert E. Fusenig; Deutsches Krebsfor-
schungsinstitut Heidelberg, Deutschland), wurde die

5 DNA-Syntheseleistung anhand des BrdU-Einbaus (Cell Proliferation ELISA, BrdU colorimetric - Boehringer Mannheim, Mannheim, Deutschland) in die DNA nach 24 h Inkubationsdauer bestimmt. Für die folgenden untersuchten Hyaluronsäurefragmente konnte keine toxische Reaktion der Zellen beobachtet werden. Die Ergebnisse (Abb. 1 bis 5) sprechen für eine sehr gute Verträglichkeit der abgebauten Moleküle als auch der unverdaulichen Hyaluronsäure.

10

15 Beispiele für die protektive Wirkung von Hyaluronsäurefragmenten gegenüber UVB-Strahlung
(Abbildungen 6 bis 11)

20 Die Hyaluronsäurefragmente, die auf die HaCaTKeratinozyten keinen toxischen Einfluß zeigten, wurden auf ihre protektiven Eigenschaften gegenüber UVB bestrahlten Keratinozyten untersucht. Dazu wurden die entsprechenden Zellen jeweils 1 h, 24 h, 48 h und 72 h mit dem jeweiligen Fragment vorinkubiert und dann einer Bestrahlungsdosis von 120 mJ/cm² (UVB) ausgesetzt. Dies führte zu einer 50-60 %igen Schädigung der bestrahlten Kontrolle im Vergleich zur unbestrahlten Kontrolle. Der Vitalitätstest zur Bestimmung der Anzahl der lebenden Zellen [SCHRÖDER, H et al., Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 347: 664-666 (1993)] fand stets 24 h nach der Bestrahlung statt.

25

30

35 Die vorliegenden Ergebnisse zeigen protektive Wirkungen der erfindungsgemäßen Fragmente der Hyaluronsäure gegenüber der Noxe UVB, die im Einzelfall den entsprechenden Abbildungen 6 bis 10 zu entnehmen sind.

Für die Effektivität der Protektion können, aus den Ergebnissen resultierend, Abhängigkeiten von der Vorinkubationsdauer und der verwendeten Konzentration abgeleitet werden. Eine Filterwirkung der untersuchten 5 Fragmente lässt sich nach den vorliegenden Absorptionsspektren ausschließen (siehe Abb. 11). Somit kann eine Radikalbildung, erzeugt durch die Bestrahlung mit UV-Licht, durch die Anwesenheit der erfundungsgemäßen von Hyaluronsäurefragmente vermindert 10 werden.

ERSATZBLATT (REGEL 26)

Beispiele für galenische Formulierungen in welche die erfundungsgemäßen Hyaluronsäurefragmenten eingearbeitet wurden (Quelle der Rezeptur)

Wasserhaltige Hydrophile Salbe (DAB)

Hyaluronsäurefragment	2,00%
Lanette [®] N (Emulgierender Cetylstearylalkohol DAB 10)	9,00%
Paraffinum subliquidum (Dickflüssiges Paraffin)	10,50%
Vaselineum album (Weißes Vaselin)	10,50%
Aqua bidestillata	ad 100,00%

Wasserhaltige Wollwachsalkoholsalbe (DAB)

Hyaluronsäurefragment	2,00%
Alcoholes Lanae (Wollwachsalkohole)	3,00%
Alcohol cetystearyllicus (Cetylstearylalkohol)	0,25%
Vaselineum album (Weißes Vaselin)	46,75%
Aqua bidestillata	ad 100,00%

O/W-Emulsion

Cetylstearat/PEG 100 Stearat	3,00%
Cetylstearylalkohol 20 EO	1,00%
Cetylstearylalkohol	1,15%
Polydimethylsilicon 100	1,00%
Capryl-/Caprinsäuretriglycerid	4,00%
Diocetylterher	5,00%
4-Methoxy-zimtsäure-2-ethylhexylester	3,00%
4-Methoxy-zimtsäure-isoamylester	3,00%
Glycerol	3,00%
Magnesiumaluminiumsilicat	1,00%
Zinköl	5,00%
Hyaluronsäurefragment	2,00%
Aqua bidestillata	ad 100,00%

Unguentum emulsificans aquosum (SR)

Alcoholes emulsificans	21,00%
Cera perliquida	10,00%
Glycerolum	5,00%
Propylium hydroxybenzoicum	0,06%
Methylium hydroxybenzoicum	0,14%
Ethanolum (90 Vol.-%)	1,80%
Hyaluronsäurefragment	2,00%
Aqua bidestillata	ad 100,00%

Hydrogel

4-Methoxy-zimtsäure-2-ethylhexylester	3,50%
1-(4- <i>tert.</i> -Butylphenyl)-3-(4'methoxyphenyl)-propan-1,3-dion	1,00%
Tocopherolaceatat	1,00%
Hyaluronsäurefragment	2,00%
Acrylat-Copolymer Carboset 514	10,00%
Ethanol	ad 100,00%

Basiscreme DAC

Glycerolmonosterarat 60	4,00%
Cetylalkohol	6,00%
Mittelkettige Triglyceride	7,50%
Weiße Vaselin	25,50%
Macrogol-100-glycerolmonosterarat	7,00%
Propylenglykol	10,00%
Tocopherolaceatat	1,00%
Hyaluronsäurefragment	2,00%
Wasser	ad 100,00%

(NRF)

Sorbitanmonosterarat 60	2,00%
Macrogolsterarat 400	3,00%
Glycerol 85%	5,00%
Mittelkettige Triglyceride	5,00%
Wasserfreie Citronensäure	0,07%
Kaliumsorbitat	0,14%
Tocopherolaceatat	0,50%
Hyaluronsäurefragment	1,00%
Wasser	ad 100,00%

Patentansprüche

5 1. Mittel zum Schutz und Erhaltung bzw. zur Rekonstruktion der normalen Funktion und Struktur der menschlichen oder tierischen Haut und/oder Schleimhaut und zur Verhinderung umweltbedingter, einschließlich UV-bedingter Hautschäden,

10 gekennzeichnet dadurch,

15 daß es ein enzymatisch aus Hyaluronsäure hergestelltes Fragmentgemisch sowie pharmazeutische Träger und/oder hydrophile und/oder lipophile Wirkstoffe und/oder Hilfsstoffe enthält.

20 2. Mittel nach Anspruch 1,
 gekennzeichnet dadurch, daß als Enzym eine mikrobielle Hyaluronatlyase eingesetzt worden ist.

25 3. Mittel nach Anspruch 1 oder 2,
 gekennzeichnet dadurch, daß zur Herstellung des Fragmentgemisches eine entweder aus Gewebe hergestellte oder mikrobiell gewonnene Hyaluronsäure in wässriger Lösung mit einer mikrobiellen Hyaluronatlyase partiell verdaut worden ist.

30 4. Mittel nach Anspruch 1 oder 2,
 gekennzeichnet dadurch, daß Hyaluronsäure in wässriger Lösung mit einer mikrobiellen Hyaluronatlyase in Träger-immobilisierter Form partiell verdaut worden ist.

5. Mittel nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 4,
5 gekennzeichnet dadurch, daß zur Herstellung des Fragmentgemisches Hyaluronsäure in wässriger Lösung mit einer aus *Streptococcus agalactiae* gewonnenen Hyaluronatlyase partiell verdaut worden ist.

10 6. Mittel nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 5,
10 gekennzeichnet dadurch, daß die aus *Streptococcus agalactiae* gewonnene Hyaluronatlyase eine Molmasse im Bereich von 116 kD und einen isoelektrischen Punkt im Bereich von IP = 8,6 besitzt.

15 7. Mittel nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 6,
15 gekennzeichnet dadurch, daß das Fragmentgemisch eine mittlere Molmasse zwischen 1.000 und 1.500.000 D, vorzugsweise zwischen 10.000 und 300.000 D aufweist.

20 8. Mittel nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 7,
20 gekennzeichnet dadurch, daß der Formulierung das Hyaluronsäurefragmentgemisch in flüssiger Form mit Konzentrationen von 1,0 g/l bis 500 g/l in Mengen von 0,01 bis 0,7 g pro g Formulierung zugemischt worden ist.

25 9. Mittel nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 7,
25 gekennzeichnet dadurch, daß der Formulierung das Hyaluronsäurefragmentgemisch in fester Form mit

in Mengen von 0,01 bis 0,7 g pro g Formulierung zugemischt worden ist.

10. Mittel nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 9,
5 gekennzeichnet dadurch, daß es als Paste, Salbe, Creme, Emulsion, Gel, Stiftmasse, bevorzugt als O/W-Emulsion vorliegt.

10. 11. Mittel nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 10,
15 gekennzeichnet dadurch, daß in den Formulierungen pharmazeutische Träger und/oder hydrophile und/oder lipophile Wirkstoffe und/oder Hilfsstoffe vorhanden sind.

12. Mittel nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 11,
20 gekennzeichnet dadurch, daß das Hyaluronsäure-fragmentgemisch und/oder die Wirkstoffe und/oder die Hilfsstoffe in kolloidale Trägersysteme, vorzugsweise in Nanopartikel, Liposomen oder Mikroemulsionen eingearbeitet vorliegen.

25. 13. Mittel nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 12,
gekennzeichnet dadurch, daß als Hilfsstoff Penetrationsmodulatoren eingesetzt werden.

30. 14. Mittel nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 12,
35. gekennzeichnet dadurch, daß als Penetrationsmodulator Harnstoff im Konzentrationsbereich von 0,01 bis 0,4 g Harnstoff pro g Formulierung vorhanden ist.

5

15. Mittel nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 14,
gekennzeichnet dadurch, daß neben dem Hyaluronsäurefragmentgemisch Substanzen mit Radikalfängereigenschaften, vorzugsweise Vitamin E und Vitamin C eingearbeitet worden sind.

1/11

Abbildung 1 DNA-Syntheseleistung von HaCaT-Keratinozyten unter Einfluß von Hyaluronsäurefragmenten einer mittleren Molmasse von 223000 g/mol Inkubationsdauer 24 h

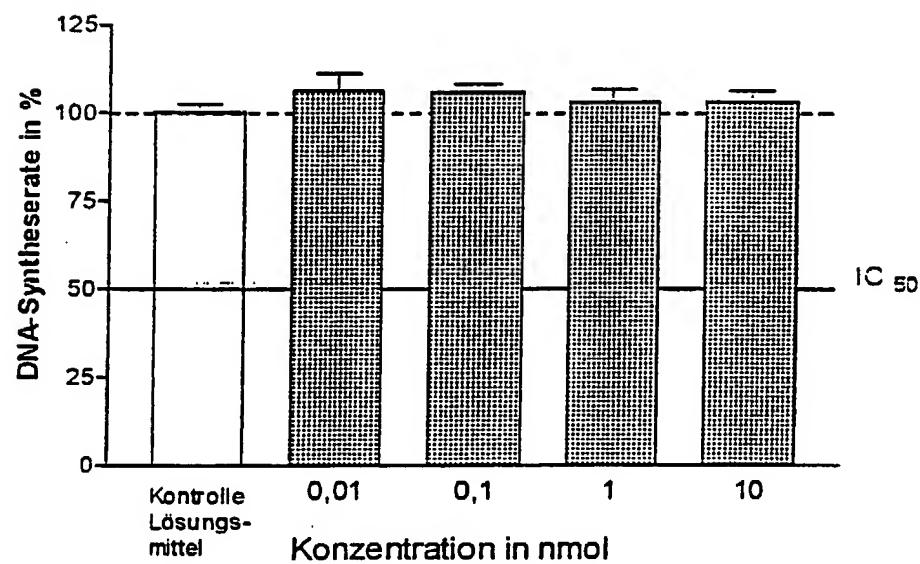


Abbildung 2 DNA-Syntheseleistung von HaCaT-Keratinozyten unter Einfluß von Hyaluronsäurefragmenten einer mittleren Molmasse von 338000 g/mol Inkubationsdauer 24 h

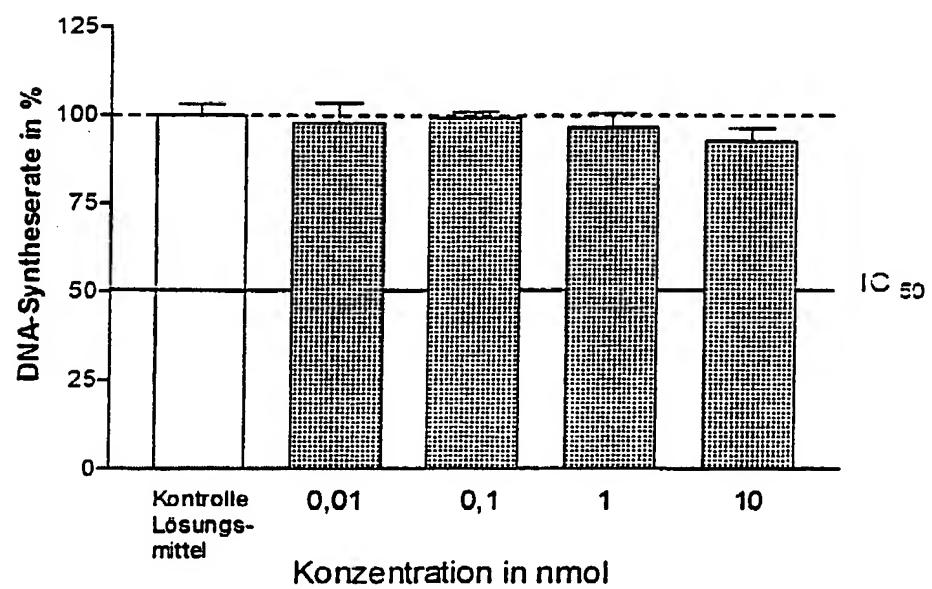


Abbildung 3 DNA-Syntheseleistung von HaCaT-Keratinozyten unter Einfluß von Hyaluronsäurefragmenten einer mittleren Molmasse von 349000 g/mol Inkubationsdauer 24 h

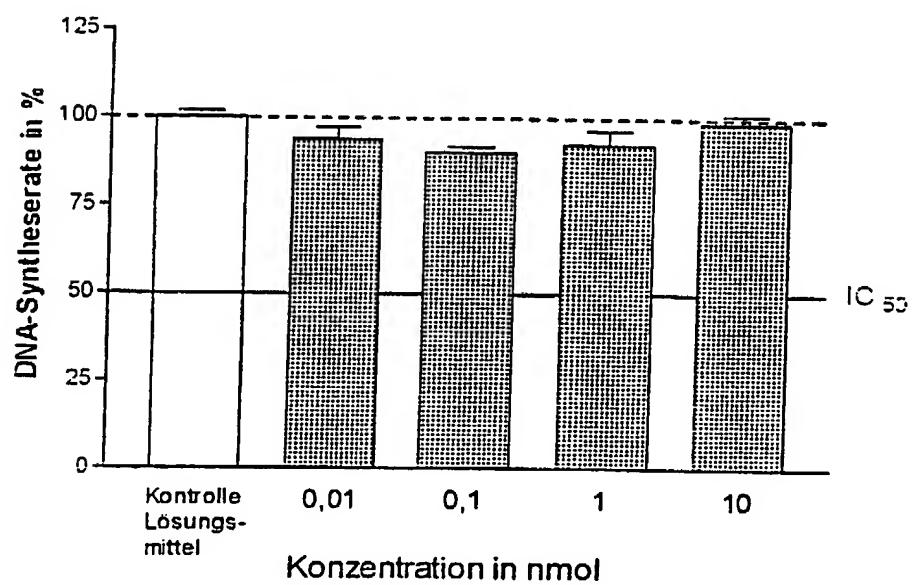
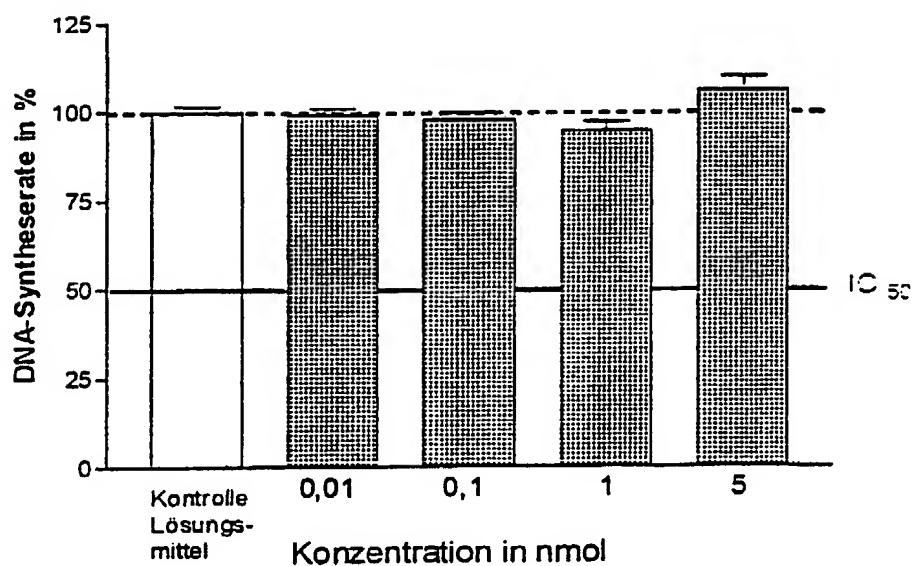


Abbildung 4 DNA-Syntheseleistung von HaCaT-Keratinozyten unter Einfluß von Hyaluronsäurefragmenten einer mittleren Molmasse von 600700 g/mol, Inkubationsdauer 24 h



5/11

Abbildung 5 DNA-Syntheseleistung von HaCaT-Keratinozyten unter Einfluß von Hyaluronsäure einer mittleren Molmasse von 1.001.000 g/mol, Inkubationsdauer 24 h

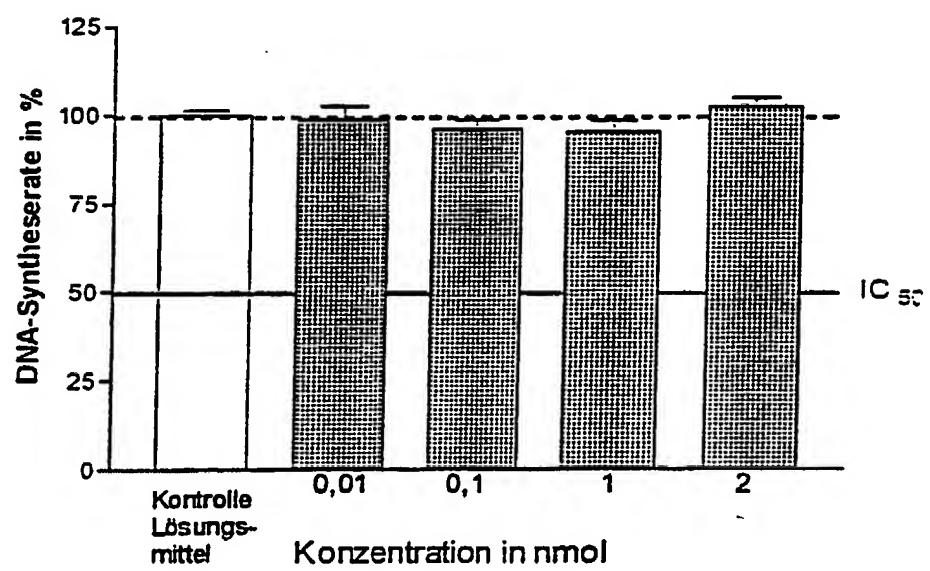


Abbildung 6 Bestimmung der Lebendzellanzahl 24 h nach UV-B Bestrahlung (120 mJ/cm^2) mittels Vitalfärbung bei vorheriger Inkubation mit Hyaluronsäure-fragmenten einer mittleren Molmasse von 223000 g/mol für 1 h, 24 h, 48 h bzw. 72 h (* = signifikant zur bestrahlten Kontrolle, $p < 0,01$, $n = 24$)

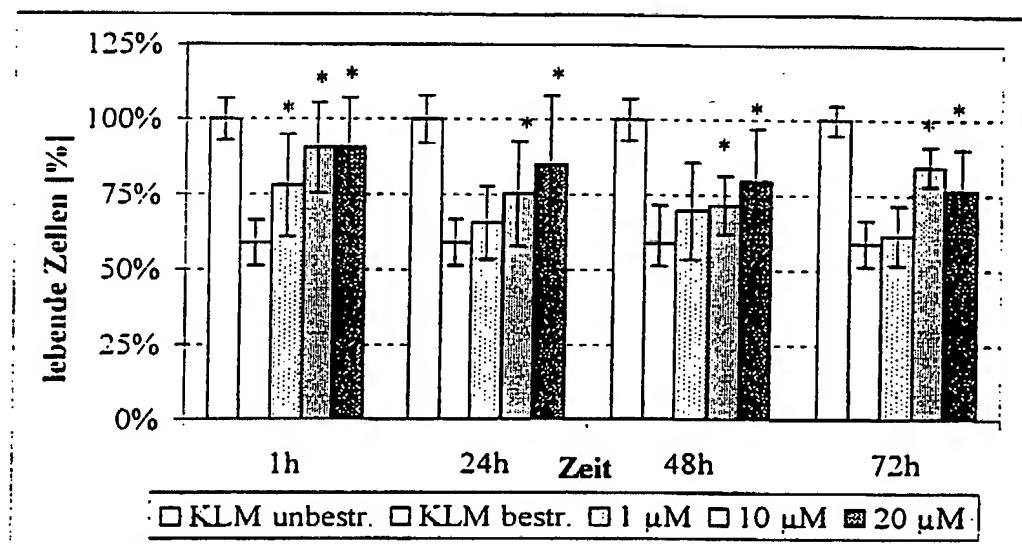


Abbildung 7 Bestimmung der Lebendzellanzahl 24 h nach UV-B Bestrahlung (120 mJ/cm^2) mittels Vitalfärbung bei vorheriger Inkubation mit Hyaluronsäure-fragmenten einer mittleren Molmasse von 338000 g/mol für 1 h, 24 h, 48 h bzw. 72 h (* = signifikant zur bestrahlten Kontrolle, $p < 0,01$, $n = 24$)

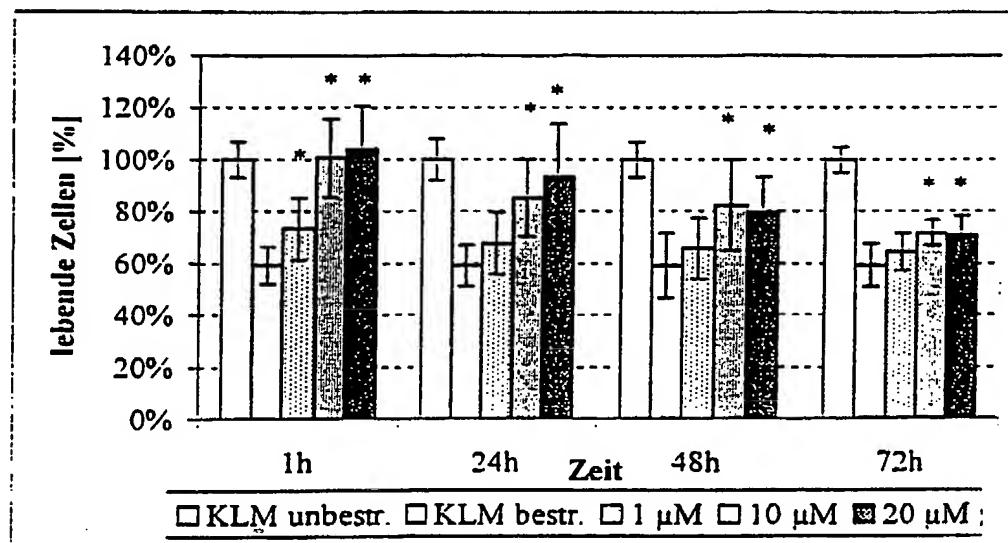
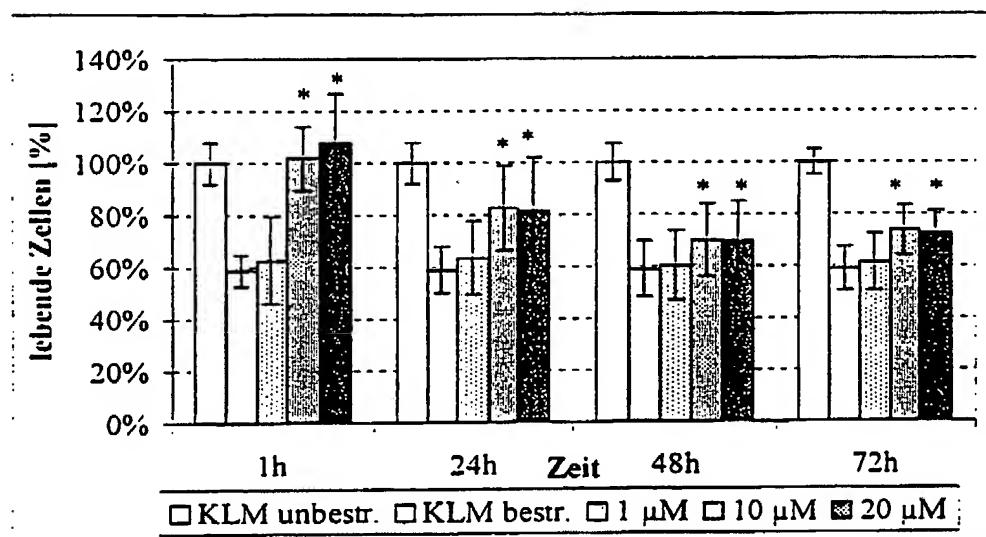
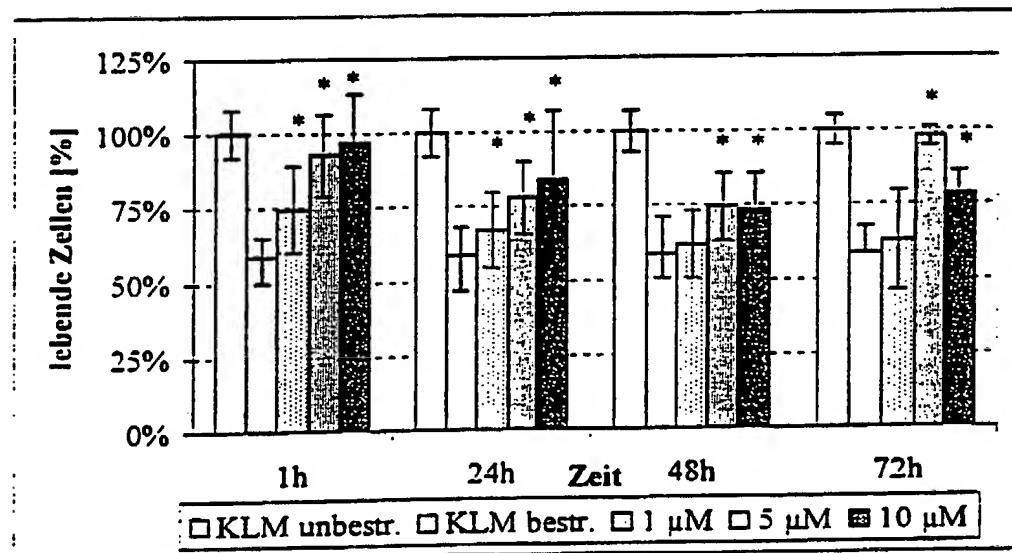


Abbildung 8 Bestimmung der Lebendzellanzahl 24 h nach UV-B Bestrahlung (120 mJ/cm^2) mittels Vitalfärbung bei vorheriger Inkubation mit Hyaluronsäure-fragmenten einer mittleren Molmasse von 349000 g/mol für 1 h, 24 h, 48 h bzw. 72 h (* = signifikant zur bestrahlten Kontrolle, $p < 0,01$, $n = 24$)



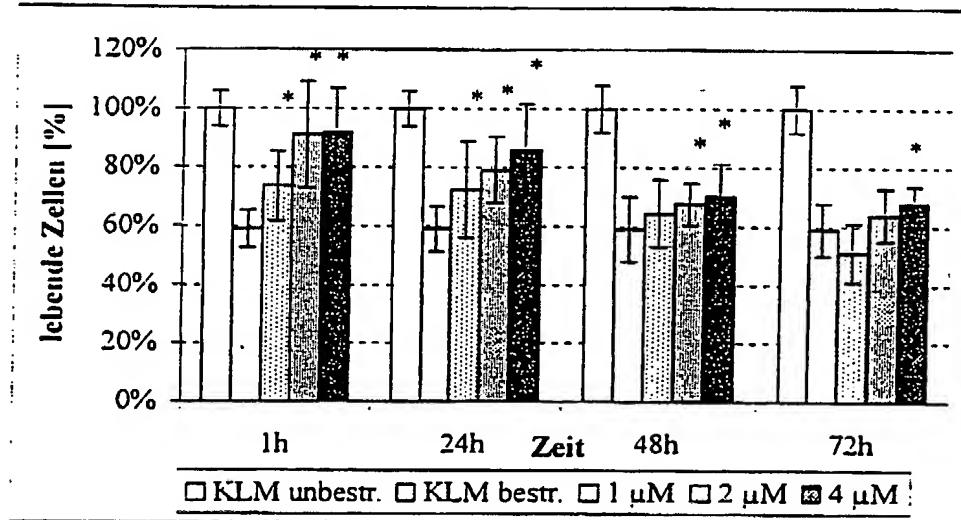
9/11

Abbildung 9 Bestimmung der Lebendzellanzahl 24 h nach UV-B Bestrahlung (120 mJ/cm^2) mittels Vitalfärbung bei vorheriger Inkubation mit Hyaluronsäure-fragmenten einer mittleren Molmasse von 600700 g/mol für 1 h, 24 h, 48 h bzw. 72 h (* = signifikant zur bestrahlten Kontrolle, $p < 0,01$, $n = 24$)



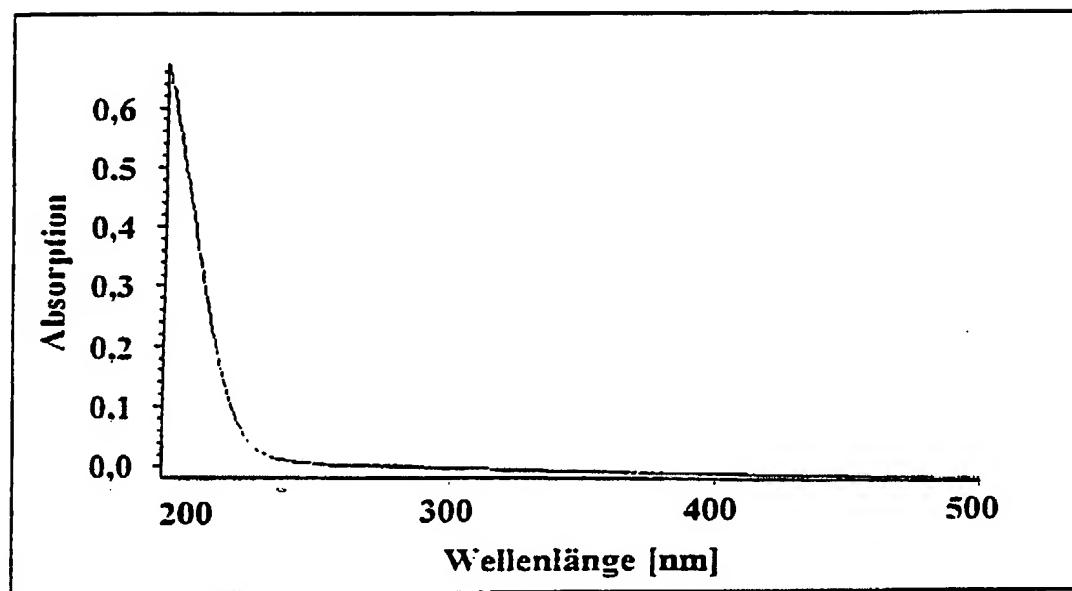
10/11

Abbildung 10 Bestimmung der Lebendzellanzahl 24 h nach UV-B Bestrahlung (120 mJ/cm²) mittels Vitalfärbung bei vorheriger Inkubation mit Hyaluronsäure einer mittleren Molmasse von 1001000 g/mol für 1 h, 24 h, 48 h bzw. 72 h (* = signifikant zur bestrahlten Kontrolle, p < 0,01, n = 24)



11/11

Abbildung 11 Absorptionsspektrum der Hyaluronsäurefragmente der mittleren Molekülgöße von 223000 g/mol



ERSATZBLATT (REGEL 26)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Internal Application No

PCT/EP 99/10336

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 A61K7/48 A61K31/715

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>DATABASE WPI Week 199725 Derwent Publications Ltd., London, GB; AN 1997-275410 XP002135344 & JP 09 098739 A (HAYASHI), 15 April 1997 (1997-04-15) abstract</p> <p>—</p>	1-3
X	<p>DATABASE WPI Week 199502 Derwent Publications Ltd., London, GB; AN 1995-012460 XP002135345 & KR 9 400 998 B (PACIFIC IND. CO.), 8 February 1994 (1994-02-08) abstract</p> <p>—</p> <p>—/—</p>	1-3

Further documents are listed in the continuation of box C.

Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

11 April 2000

Date of mailing of the international search report

25/04/2000

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl.
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Alvarez Alvarez, C

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP 99/10336

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X,P	DATABASE WPI Week 199929 Derwent Publications Ltd., London, GB; AN 1999-341642 XP002135346 & JP 11 124401 A (CHISSO CORP.), 11 May 1999 (1999-05-11) abstract —	1-3
A	DATABASE WPI Week 198725 Derwent Publications Ltd., London, GB; AN 1987-173696 XP002135347 & JP 62 104579 A (KYOWA HAKKO KOGYO KK), 15 May 1987 (1987-05-15) abstract —	5
A	DE 197 23 308 A (WOHLRAB ET AL.) 10 December 1998 (1998-12-10) claim 1 —	13,14
A	US 5 571 503 A (MAUSNER) 5 November 1996 (1996-11-05) cited in the application column 3, line 18 - line 53 —	1,15
A	US 4 303 676 A (BALAZS) 1 December 1981 (1981-12-01) cited in the application claims 1-10 —	1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

Internal Application No

PCT/EP 99/10336

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)		Publication date
JP 9098739	A	15-04-1997	NONE		
KR 9400998	B	08-02-1994	NONE		
JP 11124401	A	11-05-1999	NONE		
JP 62104579	A	15-05-1987	NONE		
DE 19723308	A	10-12-1998	NONE		
US 5571503	A	05-11-1996	NONE		
US 4303676	A	01-12-1981	DE 3125260 A FR 2478468 A GB 2099826 A, B	20-01-1983 25-09-1981 15-12-1982	

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Intern. Aktenzeichen
PCT/EP 99/10336

A. KLASSEFIZIERTUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 7 A61K7/48 A61K31/715

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestpräzisierung (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
IPK 7 A61K

Recherchierte aber nicht zum Mindestpräzisierung gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	<p>DATABASE WPI Week 199725 Derwent Publications Ltd., London, GB; AN 1997-275410 XP002135344 & JP 09 098739 A (HAYASHI), 15. April 1997 (1997-04-15) Zusammenfassung</p> <p>—</p>	1-3
X	<p>DATABASE WPI Week 199502 Derwent Publications Ltd., London, GB; AN 1995-012460 XP002135345 & KR 9 400 998 B (PACIFIC IND. CO.), 8. Februar 1994 (1994-02-08) Zusammenfassung</p> <p>—</p> <p>—/—</p>	1-3

Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

Siehe Anhang Patentfamilie

- * Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :
- *A* Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist
- *E* Älteres Dokument, das jedoch eher am oder nach dem Internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist
- *L* Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)
- *O* Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht
- *P* Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

- *T* Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzipielle oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist
- *X* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erforderlicher Tätigkeit beruhend betrachtet werden
- *Y* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erforderlicher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann nahelegend ist
- *Z* Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

Absendedatum des Internationalen Recherchenberichts

11. April 2000

25/04/2000

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentamt 2
NL - 2280 HV Almelo
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 851 epo nl.
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Alvarez Alvarez, C

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Interna. je Aktenzeichen
PCT/EP 99/10336

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X, P	DATABASE WPI Week 199929 Derwent Publications Ltd., London, GB; AN 1999-341642 XP002135346 & JP 11 124401 A (CHISSO CORP.), 11. Mai 1999 (1999-05-11) Zusammenfassung	1-3
A	DATABASE WPI Week 198725 Derwent Publications Ltd., London, GB; AN 1987-173696 XP002135347 & JP 62 104579 A (KYOWA HAKKO KOGYO KK), 15. Mai 1987 (1987-05-15) Zusammenfassung	5
A	DE 197 23 308 A (WOHLRAB ET AL.) 10. Dezember 1998 (1998-12-10) Anspruch 1	13, 14
A	US 5 571 503 A (MAUSNER) 5. November 1996 (1996-11-05) in der Anmeldung erwähnt Spalte 3, Zeile 18 – Zeile 53	1, 15
A	US 4 303 676 A (BALAZS) 1. Dezember 1981 (1981-12-01) in der Anmeldung erwähnt Ansprüche 1-10	1

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internat. Aktenzeichen

PCT/EP 99/10336

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
JP 9098739 A	15-04-1997	KEINE	
KR 9400998 B	08-02-1994	KEINE	
JP 11124401 A	11-05-1999	KEINE	
JP 62104579 A	15-05-1987	KEINE	
DE 19723308 A	10-12-1998	KEINE	
US 5571503 A	05-11-1996	KEINE	
US 4303676 A	01-12-1981	DE 3125260 A FR 2478468 A GB 2099826 A,B	20-01-1983 25-09-1981 15-12-1982